

氏名（本籍）	吉田 康人（東京都）
学位の種類	博士(生命科学)
学位記番号	博 乙第6号
学位授与の日付	2020年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	酵母菌体のコレステロール低下活性に関する研究
論文審査委員	(主査) 柳 茂 教授 井上 英史 教授 深見 希代子 教授 田中 弘文 教授

論文内容の要旨

近年、数多くの疫学調査、臨床知見の結果から、高コレステロール血症が心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の主要なリスク因子の一つであること、また、血中のコレステロールレベルを低下させることによって心筋梗塞による死亡率が減少することが示されている。このような知見に基づいて、コレステロール低下作用を有する薬剤、食品成分の探索研究が盛んに行なわれている。

酵母は多彩な発酵特性を有することから、古くから人類はビールやパン、発酵乳等の製造に酵母を利用してきた。また、その菌体自身には食物繊維やタンパク質等が豊富に含まれていることから、栄養供給を目的としてドライイーストとしても摂取されてきた。近年、ドライイーストの保健機能について多くの研究が行なわれており、コレステロール低下作用や抗腫瘍活性等を有すると報告されている。しかし、コレステロール低下作用に関しては、*Saccharomyces cerevisiae* のビール酵母やパン酵母の摂取によって血中コレステロール濃度が低下したとの報告がある一方、変化しなかったとの報告も複数存在する。また、多種類の酵母が食品分野で利用されているが、コレステロール低下活性が調べられている菌株は少なく、菌種や菌株によってコレステロール低下活性が異なるのかは不明であった。さらに、その作用機序や活性成分についても十分な検討は行われていなかった。そこで、著者らは、酵母の中から高コレステロール血症の予防・改善に利用できる素材を探索するとともに、その活性成分、作用機序およびヒトにおける有効性に関する研究を行った。

第1章 各種酵母菌体のコレステロール低下活性の比較

食品由来または発酵食品製造に使用されている酵母、19属58種81株について、高コレステロール負荷ラットを用いてコレステロール低下活性を比較した。その結果、酵母のコレステロール低下活性は菌種や菌株によって大きく異なることが明らかになった。81株の中で最も高いコレステロール低下活性を示したのは、*Kluyveromyces marxianus* YIT 8292であった。本菌株の用量依存性を調べた結果、血漿総コレステロールレベルは投与量依存的に低下し、3%混餌投与した場合でもその低下は有意であった。一方、食品に広く利用されているビール酵母やパン酵母等は10%混餌投与しても血漿総コレステロール濃度を変化させなかった。よって、*K. marxianus* YIT 8292は高コレステロール血症の予防・改善に寄与する新規の食品素材の候補として有望と考えられた。

第2章 *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292の活性成分と作用メカニズム

K. marxianus YIT 8292の活性成分を明らかにするために、菌体を分画し、高コレステロール負荷マウスを用いて各画分のコレステロール低下活性を比較した。まず、菌体を加熱して、粗細胞壁画分(KM-CW)と水溶性抽出物-1に分画した。さらにKM-CWを物理的に破碎して細胞壁画分(KM-W)と水溶性抽出物-2に分画した。高コレステロール負荷ラットの血漿総コレステロール濃度は、KM-CWとKM-Wを投与した場合にのみ有意に低下したことから、*K. marxianus* YIT 8292のコレステロール低下活性に関わる細胞構成成分が細胞壁に局在することが示唆された。酵母の細胞壁の主要構成成分は、 β -グルカンと α -マンナンから成る不溶性の食物繊維であることから、さらに、これらの多糖の関与について検証を行なった。KM-CWを3種類の酵素、すなわちプロテアーゼ、 α -マンノシダーゼおよび β -グルカナーゼを用いて消化し、高コレステロール負荷ラットを用いて各分解産物のコレステロール低下活性を比較した。その結果、KM-CWの α -マンナンおよび β -グルカンのどちらか一方を酵素的に分解するとコレステロール低下活性は低下し、また、両多糖を同時に分解した場合にはほぼ完全にコレステロール低下活性が消失した。よって、*K. marxianus* YIT 8292の主たる活性成分は細胞壁多糖の α -マンナンおよび β -グルカンであることが示された。

K. marxianus YIT 8292によるコレステロール低下の作用メカニズムを検討した結果、KM-CWとKM-Wは、中性ステロールの糞便排泄量を有意に増加させたことから、コレステロール吸収を抑制する可能性が考えられた。また、KM-CWとKM-Wはコレステロールの主要な異化産物である胆汁酸の糞便排泄量を有意に増加させるとともに、肝臓における胆汁酸合成の律速酵素であるコレステロール7 α -水酸化酵素の活性を有意に上昇させた。よって、*K. marxianus* YIT 8292は胆汁酸の糞便排泄量を増加させることによって、コレステロールの胆汁酸への異化を促進することが示唆された。さらに盲腸内のプロピオン酸および総短鎖脂肪酸の濃度は、KM-CWとKM-Wの投与によって有意に上昇した。短鎖脂肪酸、特にプロピオン酸はコレステロール生合成を抑制する作用を有すると言われていることから、*K.*

marxianus YIT 8292 のコレステロール低下活性にその腸内発酵産物である短鎖脂肪酸の関与も示唆された。

以上の結果から、*K. marxianus* YIT 8292 の主たる活性成分は、細胞壁に局在する α -マンナンと β -グルカンであること、また、高コレステロール負荷ラットにおいて小腸のコレステロール吸収の抑制、胆汁酸排泄の促進、および短鎖脂肪酸の産生を介してコレステロール低下活性を示すことが示唆された。

第 3 章 酵母細胞壁の表層多糖の構造とコレステロール低下活性との相関

酵母細胞壁は主に β -グルカンから成る内層とその表面を覆う α -マンナンを豊富に含む外層から構成されている。細胞壁に占める β -グルカンと α -マンナンの割合、およびそれら多糖の構造は菌株によって異なると言われているが、中でも α -マンナンの N 結合型糖鎖の側鎖構造には顕著な違いがあり、酵母の血清学的分類に利用されている。*K. marxianus* YIT 8292 の α -マンナンの側鎖構造を解析した結果、*S. cerevisiae* 等とは異なり、リン酸基含量が少なく、 α -(1,2)-結合の短い側鎖が α -(1,6)-結合の主鎖に連結した、くし状の構造であることが分かった。このような α -マンナンの側鎖構造の特徴とコレステロール低下活性との関連性を明らかにするため、マンナン側鎖の合成経路に欠損を持つ *S. cerevisiae* X2180-1A の各種変異株と野生株のコレステロール低下活性を高コレステロール食負荷ラットを用いて比較した。その結果、側鎖の伸長とリン酸化を欠損した *mn5* 変異株のコレステロール低下活性は、野生株よりも有意に高く、*K. marxianus* YIT 8292 とほぼ同等であることが示された。よって、 α -マンナンの側鎖長とリン酸基含量がコレステロール低下活性に影響を及ぼすことが明らかになった。

第 4 章 *K. marxianus* YIT 8292 粗細胞壁のヒトにおけるコレステロール低下作用

KM-CW のヒトにおける有効性について検討を行った。まず、血清総コレステロール濃度が高めに被験者を対象に、錠剤の形態で KM-CW を 1 日 8.0、4.0、2.0 あるいは 1.0 g ずつ 4 週間摂取させたところ、4.0 g/日以上用量で血中の総コレステロールと LDL-コレステロールが摂取前に比べて有意に低下した。さらに、血清総コレステロールレベルが正常域の健康者と軽度高コレステロール血症者を対象として、KM-CW を 3.0 g または 4.0 g 配合したヨーグルトを 8 週間摂取させる二重盲検プラセボ対照試験を実施した。その結果、4.0 g 配合のヨーグルトを摂取した群では、摂取前に比べて総コレステロールと LDL-コレステロールが有意に低下し、摂取 8 週目の総コレステロール濃度はプラセボ群と比較して有意に低値であった。また、被験者の中から軽度高コレステロール血症者のみを抽出した場合、3.0 g 配合ヨーグルトの摂取でも血清総コレステロールと LDL-コレステロールが有意に低下した。しかし、正常域の被験者のみを抽出した場合には、3.0 g、4.0 g 配合ヨーグルトともに変化が認められなかった。高コレステロール血症者の 8 週目の総コレステロールは、プラセボ群よりも 3.0 g あるいは 4.0 g 配合ヨーグルトの摂取群において有意に低かった。よって、KM-CW は血清総コレステロール濃度が高めの被験者に対して有効であり、その最小有効用量は 3~4 g/日程度であ

と考えられた。

以上、本研究によって、高いコレステロール低下活性を有する *K. marxianus* YIT 8292 を見出すとともに、その主たる活性成分と作用機序、ヒトにおける有効性を示した。これらの研究成果は、酵母の機能性研究を発展させると同時に、多糖類の構造活性相関研究に新たな知見を加え、また、高コレステロール血症の予防・改善に新たな可能性を提示するものと期待している。

【研究結果の掲載誌】

- | | |
|---|--------|
| (1) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | (2004) |
| (2) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | (2005) |
| (3) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | (2007) |
| (4) Journal of Agricultural and Food Chemistry | (2009) |

以上

審査結果の要旨

近年、数多くの疫学調査、臨床知見の結果から、高コレステロール血症が心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の主要なリスク因子の一つであること、また、血中のコレステロールレベルを低下させることによって心筋梗塞による死亡率が減少することが示されている。このような知見に基づいて、コレステロール低下作用を有する薬剤、食品成分の探索研究が盛んに行なわれている。申請者は、酵母の中から高コレステロール血症の予防・改善に利用できる素材を探索するとともに、その活性成分、作用機序およびヒトにおける有効性に関する研究を行った。その結果、高いコレステロール低下活性を有する *K. marxianus* YIT 8292 を見出すとともに、*K. marxianus* YIT 8292 の主たる活性成分は細胞壁多糖の α -マンナンおよび β -グルカンであることを示した。また、 α -マンナンの側鎖長とリン酸基含量がコレステロール低下活性に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、血中コレステロール値が高めの被験者に *K. marxianus* YIT 8292 の粗細胞壁画分を 4.0 /day 以上 4 週間摂取させると、血中総コレステロール値と LDL コレステロール値が低下することを見出した。これらの研究成果は、酵母の機能性研究を発展させると同時に、多糖類の構造活性相関研究に新たな知見を加え、また、高コレステロール血症の予防・改善に新たな可能性を提示した。これらの成果および質疑応答は、博士（生命科学）の審査の基準を十分満たしており学位に値すると判断した。